

بررسی مقایسه‌ای چند روش آزمایشگاهی برای جداسازی اگزوزوم‌های شیر گاو

حانیه قندچی^۱، ریحانه رمضانی^۲، سیده زهرا موسوی نژاد^۱^۱ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران ^۲ گروه خانواده درمانی، پژوهشکده زنان، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: ریحانه رمضانی، re.ramezani@alzahra.ac.ir

چکیده. امروزه اگزوزوم‌های شیر به جهت در دسترس بودن و کارایی بسیار در محصولات آرایشی-بهداشتی و همچنین به عنوان نانوحامل‌های دارویی، بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است. از آنجایی که یافتن روشی ساده و کارآمد برای جداسازی این وزیکول‌ها بسیار با اهمیت است، در این پژوهش به برخی روش‌های جداسازی اگزوزوم از شیر گاو مانند اولتراسانتریفیوژ، جداسازی با استفاده از پلیمر PEG و چند کیت تجاری داخلی پرداخته و مشخصه‌یابی اگزوزوم‌ها با استفاده از DLS و میکروسکوپ الکترونی انجام شده است. در روش اولتراسانتریفیوژ، به عنوان رایج‌ترین روش جداسازی اگزوزوم، تعداد ذرات مشاهده‌شده در تصاویر میکروسکوپ الکترونی بسیار پایین (2 ± 5) پارتیکل در هر تصویر با بزرگنمایی تقریبی $6000 \times$ برآورد شد، در حالی که در تصاویر میکروسکوپی کیت اگزوسان، تعداد ذرات زیادی (30 ± 150) پارتیکل در هر تصویر با بزرگنمایی تقریبی $30000 \times$ قابل مشاهده بود. در جداسازی با استفاده از PEG، میانگین قطر ذرات با تکنیک DLS، 263 نانومتر و بیشتر از روش‌های اولتراسانتریفیوژ، کیت اگزوسیپ و کیت آناگرو که قطر ذرات به ترتیب 176 ، 142 و 123 نانومتر بود، مشاهده گردید. میانگین قطر ذرات در تصاویر میکروسکوپی کیت اگزوسان، $30-70 \pm 10$ نانومتر بود که نتایج DLS هم کوچک‌بودن سایز ذرات جداسازی‌شده را تأیید کرد. با توجه به تعداد زیاد ذرات ریز (≤ 30 nm) در نتایج میکروسکوپی کیت اگزوسان، این احتمال می‌رود که چنین ذراتی به وفور در شیر وجود دارند و ممکن است روش‌های دیگر قادر به جداسازی این ذرات ریز نبوده‌اند. در نهایت هر چند تمامی روش‌های مطالعه شده، قابلیت جداسازی اگزوزوم از شیر را داشتند ولی برای مقایسه دقیق‌تر و معرفی یک روش استاندارد برای جداسازی اگزوزوم از شیر گاو، لازم است مطالعات گسترده‌تری صورت پذیرد.

واژه‌های کلیدی. اگزوزوم، اولتراسانتریفیوژ، رسوب‌دهی با پلیمر، شیر، وزیکول‌های خارج سلولی

Comparative study of several laboratory methods for isolating exosomes from bovine milk

Hanieh Ghandchi¹, Reihaneh Ramezani², Zahra Moosavinejad¹¹ Biotechnology department, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran² Department of Family Therapy, Women Research Center, Alzahra University, Tehran, Iran

Corresponding author: Reihaneh Ramezani, re.ramezani@alzahra.ac.ir

Abstract. Recently, milk exosomes have attracted much attention from researchers due to their availability and efficiency in cosmetic products and also as drug delivery nanocarriers. Since it is very important to find a simple and efficient method to purify these vesicles, in this research some methods of exosome isolation from bovine milk such as ultracentrifugation, using PEG polymer and several commercial kits were discussed and characterized. Detection of exosomes has been done using DLS and electron microscopy.

In ultracentrifugation, as the most common method of exosome isolation, the number of particles in the electron microscope images was estimated to be very low (5 ± 2 particles), while in the microscopic images of the Exosun kit, a large number of exosomes (150 ± 30 particles) was visible. In PEG precipitation, the average diameter of the particles in DLS results was 263 nm and more than the ultracentrifugation, Exocib and Anaexo kit, where the diameter of the particles was 176 nm, 142 nm, and 123 nm, respectively. The average diameter of the particles in the microscopic images of the Exosun kit was $30-70 \pm 10$ nm, and DLS results confirmed the small size of the isolated particles. Considering the large number of small particles (≤ 30 nm) in the microscopic results of the exosun kit, other methods may not have been able to isolate these small particles. Finally, although all the studied methods were able to isolate exosome from milk, more extensive studies are necessary to make a more accurate comparison and to introduce a standard method for isolating exosome from bovine's milk.

Key words. exosome, extracellular vesicles, milk, polymer precipitation, ultracentrifugation

مقدمه

پروتئین های شاخص اگزوزوم می توان به توبولین، اکتین، CD9، CD82، CD81 و CD63، از مهم ترین لیپیدها می توان به فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل سرین و فسفاتیدیل اتانول آمین اشاره کرد (Yang et al., 2019). این وزیکول ها که دارای غشای دولایه لیپیدی هستند در مقایسه با حامل های مصنوعی مانند لیپوزوم ها و نانوذرات، مزایای گسترده و منحصر به فردی در زمینه تشخیص و درمان بیماری ها دارند. تقریباً تمام انواع سلول های انسانی می توانند اگزوزوم تولید کنند، همانند MSC، HUVECs، سلول های T، سلول های B، ماکروفاژها، NK، DC (Y. Zhang et al., 2020).

در حال حاضر انواع مختلفی از اگزوزوم ها مورد بهره برداری قرار گرفته اند؛ به عنوان مثال، اگزوزوم های مشتق از تومور برای درمان آب آوردگی شکم یا آسیت بدخیم (malignant ascites) و اگزوزوم های مشتق از دندریتیک سل ها برای درمان ملانوما. بنابراین اگزوزوم ها پتانسیل زیادی برای کاربردهای بالینی دارند. با این حال برخی معایب، مانند بازده محدود، زمان بر بودن و مشکلات اخلاقی، استفاده از این نوع اگزوزوم ها را با مشکلاتی مواجه کرده است. برای رفع این نواقص و موانع، اگزوزوم های شیر گاو برای اولین بار در سال ۲۰۱۰ جداسازی شدند و پس از آن داروهای شیمی درمانی داخل این وزیکول ها بارگذاری و مراحل درمان انجام شد. داروی بارگذاری شده در اگزوزوم های شیر، اثرات ضدتوموری بهتری در برابر سرطان سینه، ریه و دیگر ارگان ها نسبت به داروی آزاد نشان داد (Q. Zhang et al., 2020).

منابع فراوانی ثابت کرده اند شیر منبع وسیعی از اگزوزوم است (Bae & Kim, 2021; Melnik et al., 2021; R. Munagala et al., 2016; Sánchez et al., 2021)، در طبیعت به وفور یافت می شود و به دلیل بی خطر بودن، دسترسی آسان، کم هزینه بودن (Adriano et al., 2021) و امکان مصرف خوراکی می تواند به عنوان دارو مورد استفاده قرار گیرد. دراصل اگزوزوم های شیر می توانند به عنوان حاملی برای عوامل شیمیایی و داروها عمل کنند (Radha Munagala et al., 2016). در مطالعه ای اگزوزوم های شیر به عنوان حامل داروهای شیمی درمانی به کار گرفته شده است. این داروها بصورت آزاد با دوز بالا دارای اثربخشی هستند که در بسیاری از موارد باعث سمیت سیستمی غیرمنتظره می شوند، در صورتی که با بارگذاری آنها در اگزوزوم نه تنها از عوارض سمی این داروها کاسته می شود بلکه انتقال آنها به سلول هدف خیلی کارآمدتر به وقوع می پیوندد (Q. Zhang et al., 2020).

وزیکول های خارج سلولی شامل اگزوزوم ها، میکرووزیکول ها و آپوتوتیک بادی ها، توسط انواع سلول ها به فضای خارج سلولی آزاد می شوند. این وزیکول ها دارای غشاء دولایه لیپیدی هستند و در بیوژنز، مسیر آزادسازی، اندازه، محتویات و عملکرد با همدیگر تفاوت دارند. محتویات این وزیکول ها شامل لیپیدها، نوکلئیک اسیدها و پروتئین ها به ویژه پروتئین های مرتبط با غشای پلاسمایی، سیتوزول و متابولیسم لیپید می شود (L. M. Doyle & M. Z. Wang, 2019). اگزوزوم ها کوچکترین دسته از این وزیکول ها، اندازه ای بین ۳۰ الی ۱۵۰ نانومتر دارند (Zhou et al., 2020). در برخی منابع اندازه اگزوزوم را ۳۰ الی ۳۰۰ نانومتر در نظر گرفته اند (Jung & Mun, 2018). گروه بعدی، میکرووزیکول ها ۵۰ نانومتر الی ۱ میکرومتر هستند که بزرگتر از اگزوزوم ها بوده و به طور مستقیم از جوانه زدن غشای سیتوپلاسمی ناشی می شوند. دسته بعدی وزیکول های خارج سلولی، آپوتوتیک بادی ها هستند که از لحاظ اندازه بزرگترین دسته محسوب و در مراحل انتهایی فرایند مرگ سلولی آزاد می گردند (Kotmakçı & Erel Akbaba, 2017). اگزوزوم ها، در مایعات بیولوژیکی به طور فراوان حضور دارند و در پلاسما (Caby et al., 2005)، ادرار (Pisitkun et al., 2004)، بزاق، شیر (Lässer et al., 2011)، مایعات دستگاه تنفسی، مایع مغزی- نخاعی، سرم، مایع آمینویتیک، مایع مفصلی، اشک، لنف، صفرا و اسید معده یافت می شوند (Laura M. Doyle & Michael Zhuo Wang, 2019).

اگزوزوم ها در داخل سیتوپلاسم سلول ها و از جوانه زدن غشای اندوزوم به فضای داخلی آن منشأ می گیرند. ابتدا با اندوسیتوز، اندوزوم ابتدایی تشکیل می شود و سپس بعد از طی روند بلوغ و جوانه زدن غشای آن به سمت فضای داخلی، به اندوزوم فاز تأخیری یا اجسام چند وزیکولی به نام MVB (Multivesicular body) تبدیل می شوند. این MVB ها یا به لیوزوم متصل شده و محتویات آن ها تخریب می شود و یا به غشای سلول متصل شده و محتویات خود که همان اگزوزوم ها هستند را به فضای خارج سلولی آزاد می کنند (Yang et al., 2019).

همانطور که اشاره شد اگزوزوم ها، نانوزیکول های خارج سلولی هستند که توسط سلول ها ترشح می شوند و حامل نوکلئیک اسیدها (miRNA, mRNA, tRNA and DNA)، پروتئین ها، لیپیدها و دیگر مواد زیست فعال هستند و در فرآیند های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی بدن نقش ایفا می کنند. از

(Vaswani et al., 2017)، رسوبدهی با PEG و برخی کیت‌های تجاری داخلی (که همگی بر مبنای رسوبدهی با پلیمر طراحی شده‌اند)، به دلیل دردسترس و مقرون‌به‌صرفه بودن، انتخاب گردید و نتایج حاصل با استفاده از تکنیک‌های رایج برای مشخصه‌یابی اگزوزوم با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفتند. هدف از انجام این پژوهش بررسی و مطالعه قابلیت برخی روش‌های متداول و کم هزینه برای جداسازی اگزوزوم از شیر بود. روش اولتراسانتریفیوژ با وجود آن که به عنوان روش استاندارد طلایی و یکی از مرسوم‌ترین روش‌های جداسازی اگزوزوم شناخته شده است، به دلیل نیاز به تجهیزات گران قیمت، قابلیت به کارگیری در محصولات تجاری اگزوزوم شیر را نخواهد داشت، بنابراین معرفی روشی ساده، ارزان قیمت و با کارایی بالا می‌تواند محققین این حوزه را به استفاده از اگزوزوم‌های شیر در محصولات آرایشی و دیگر کاربردهای مهم آن تشویق نماید. اساس تمامی کیت‌های مورد مطالعه در این پژوهش، مشابه با روش جداسازی با پلی اتیلن گلیکول (PEG) است. در این روش با ایجاد یک شبکه پلیمری و به دام انداختن وزیکول‌های اگزوزومی در آن، دیگر نیازی به سانتریفیوژ با شدت بسیار بالا (۱۰۰۰۰g) نمی‌باشد. از یک طرف به دلیل ساده و ارزان قیمت بودن روش رسوبدهی با پلیمر PEG و کیت‌های تجاری انتخاب شده و از طرف دیگر کاربردهای بسیار فراوان اگزوزوم شیر، می‌توان امید داشت در آینده‌ای نزدیک اگزوزوم‌های شیر کاربردهای فراوانی در محصولات آرایشی-بهداشتی و همچنین نانوحامل‌های دارویی پیدا کنند.

مواد و روش‌ها:

مواد و دستگاه:

شیر تازه گاو (شیر خام غیرپاستوریزه) از لبنیات فروشی محلی خریداری شد. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از جمله: HCl، NaOH، PEG 6000 و سایر مواد از شرکت مرک (آلمان)، کیت اگزوسیپ از شرکت سیب‌زیست‌فن، کیت آنا-اگزو از شرکت آناسلول‌طب و بافر آماده PBS از شرکت کالاریست تهیه گردید.

قابل ذکر است تمامی سانتریفیوژها با شدت پایین (۱۵۰۰g-۳۰۰۰g) با دستگاه شرکت سیگما (مدل 2-16KL، ساخت آلمان) و اولتراسانتریفیوژها (۱۰۰۰۰g) با دستگاه Beckman Coulter (ساخت آمریکا) انجام شده است.

شیر پستانداران، مخلوط پیچیده‌ای از پروتئین‌ها، مواد معدنی و چربی‌های مختلف است که نقش مهمی در تغذیه و ایمنی نوزاد دارد. پروتئین‌های کازئین حدود ۸۰ درصد پروتئین‌های شیر گاو را تشکیل می‌دهند. ذرات کلوئیدی و میسل مانند بزرگی از ترکیب کازئین و کلسیم فسفات شکل می‌گیرد و این مسأله در جداسازی اگزوزوم‌ها از شیر مشکل ایجاد می‌کند (Mohd Younus Bhat, 2016). گاهی اگزوزوم‌ها بین این میسل‌ها قرار می‌گیرند و از دسترس خارج می‌شوند. به این منظور باید ابتدا شیر چربی‌زدایی و تا حد امکان کازئین آن حذف گردد.

اخیراً روش‌های متعددی برای جداسازی اگزوزوم مورد بررسی قرار گرفته است؛ مانند اولتراسانتریفیوژ، جداسازی با استفاده از آنتی‌بادی‌های خاص، روش‌های مبتنی بر پلیمر، میکروفلتراسیون و کروماتوگرافی. در این پژوهش به بررسی کارایی برخی از این روش‌ها در جداسازی اگزوزوم از شیر پرداخته شده است.

اولتراسانتریفیوژ به عنوان روش استاندارد طلایی، یکی از متداول‌ترین روش‌های تخلیص اگزوزوم محسوب می‌شود. پیش از انجام اولتراسانتریفیوژ باید با روش‌های مختلف، پروتئین شیر تا حد امکان حذف گردد. مزیت این روش این است که می‌توان با استفاده از آن، انواع وزیکول‌های خارج سلولی را با سرعت‌های مختلف سانتریفیوژ، جدا نمود. اگزوزوم حدوداً با ۱۰۰۰۰g جداسازی می‌شود (Coughlan et al., 2020). روش متداول بعدی، استفاده از پلیمرها برای رسوبدهی اگزوزوم است. برای جداسازی اگزوزوم می‌توان از برخی پلیمرها مانند پلی‌اتیلن-گلیکول (PEG) استفاده کرد. درواقع PEG با وزن‌های مولکولی مختلف برای رسوب دادن پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، ویروس‌ها و سایر ذرات کوچک مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش از کاهش حلالیت ترکیبات در محلول‌های پلیمری فوق آبدوست استفاده می‌کند. در این روش با مخلوط کردن نمونه و محلول پلیمری و سپس انکوباسیون، رسوبدهی وزیکول‌های خارج سلولی با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت پایین میسر می‌گردد و نیازی به سانتریفیوژ با سرعت‌های بالا و یا اولتراسانتریفیوژ نیست. همچنین از مزایای غیرقابل انکار رسوب اگزوزوم با استفاده از PEG می‌توان به سادگی و امکان کار در محدوده pH فیزیولوژیکی و وابستگی کم به غلظت یون اشاره کرد (Maria Yu Konoshenko et al., 2018). بسیاری از کیت‌های تجاری جداسازی اگزوزوم هم بر اساس رسوبدهی با PEG طراحی شده اند (Tang et al., 2017).

در این پژوهش روش اولتراسانتریفیوژ به دلیل رایج بودن در مطالعات پیشین (Kandimalla et al., 2021; Kanchan)

چربی زدایی شیر:

۶۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. ذکر این نکته لازم است که تمامی سانتریفیوژها در دمای ۴ درجه سانتی گراد صورت گرفت. سپس سوپ رویی حاصل از مرحله قبل در یک فالکن جمع-آوری و به منظور حذف ذرات باقیمانده ابتدا از فیلتر $0.4 \mu\text{m}$ و سپس از فیلتر $0.2 \mu\text{m}$ عبور داده شد. محلول ۲۰ درصد PEG 6000 و سوپ رویی حاصل از مرحله چربی زدایی و فیلتراسیون، به نسبت ۱:۱ با هم مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس با شدت ۳۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد، سانتریفیوژ گردید. سوپ رویی برداشته و رسوب آن در PBS حل شد. محلول یکنواخت حاوی اگزوزوم تا انجام تست های تأییدی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

جداسازی اگزوزوم شیر با استفاده از کیت های تجاری:**کیت اگزوسیب (Exocib)**

در این روش هم مانند روش های قبلی به منظور چربی زدایی ابتدا شیر خام با شدت ۳۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپ رویی به ظرف جدید منتقل و با شدت ۹۰۰۰ g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد سوپ رویی حاصل از مرحله قبل با شدت ۱۵۰۰۰ g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. ذکر این نکته لازم است که تمامی سانتریفیوژها در دمای ۴ درجه سانتی گراد صورت گرفت.

سپس فیلتراسیون شیر خام با فیلتر $0.4 \mu\text{m}$ و سپس با فیلتر $0.2 \mu\text{m}$ به منظور حذف ذرات باقیمانده انجام شد. برای جداسازی اگزوزوم از محلول شفاف بدست آمده، از کیت اگزوسیب (شرکت سیب زیست فن، ایران) استفاده گردید و تمامی مراحل طبق دستورالعمل کیت دنبال شد و در نهایت محلول یکنواخت حاوی اگزوزوم تا انجام تست های تأییدی در دمای ۲۰- نگهداری شد.

کیت آنا اگزو (Anaexo)

در این روش نیز همانند روش های قبلی به منظور چربی زدایی ابتدا شیر خام با شدت ۳۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپ رویی به ظرف جدید منتقل و با شدت ۹۰۰۰ g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد سوپ رویی حاصل از مرحله قبل با شدت ۱۵۰۰۰ g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. ذکر این نکته لازم است که تمامی سانتریفیوژها در دمای ۴ درجه سانتی گراد صورت گرفت. سپس فیلتراسیون شیر خام با فیلتر $0.4 \mu\text{m}$ و سپس با فیلتر $0.2 \mu\text{m}$ به منظور حذف ذرات باقیمانده انجام شد. برای جداسازی اگزوزوم از محلول شفاف بدست آمده، از کیت آنا اگزو (شرکت آنا سلول طب، ایران) استفاده گردید و تمامی مراحل طبق دستورالعمل

قبل از انجام هر یک از روش های جداسازی اگزوزوم، لازم است شیر که نمونه اصلی این پژوهش است، چربی زدایی گردد. این عمل برای افزایش بازده جداسازی اگزوزوم ضروری است (Wijenayake et al., 2021). به این منظور پس از تهیه شیر خام از لبنیات فروشی محلی (شیر با چربی کامل و بدون هیچ تیماری اعم از پاستوریزاسیون یا استریلیزاسیون)، چند مرحله سانتریفیوژ با شدت های مختلف اعمال شد تا چربی و برخی سلول های مرده از نمونه شیر حذف گردد. ابتدا ۴۰ میلی لیتر شیر خام با شدت ۳۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپ رویی به ظرف جدید منتقل و با شدت ۹۰۰۰ g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد سوپ رویی حاصل از مرحله قبل با شدت ۱۵۰۰۰ g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. ذکر این نکته لازم است که تمامی سانتریفیوژها در دمای ۴ درجه سانتی گراد صورت گرفت.

جداسازی اگزوزوم شیر با استفاده از اولتراسانتریفیوژ**(UC-HCI):**

در این روش طبق پروتکل (Yamauchi et al., 2019)، به منظور رسوب کازئین از HCl استفاده و این پروتئین حذف شد. در ابتدا پس از چربی زدایی شیر خام با سانتریفیوژ ۳۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه، به نمونه با حجم مساوی آب دیونیزه اضافه گردید. سپس با استفاده از HCl یک مولار، pH محلول به ۴/۶ رسانده شد. پس از آن جهت حذف رسوب پروتئینی حاصل، ابتدا مخلوط حاصل با شدت ۹۰۰۰ g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد سوپ رویی حاصل از مرحله قبل با شدت ۱۵۰۰۰ g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. ذکر این نکته لازم است که تمامی سانتریفیوژها در دمای ۴ درجه سانتی گراد صورت گرفت. در مرحله آخر سوپ رویی با شدت ۱۰۰۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۶۰ دقیقه اولتراسانتریفیوژ (شرکت Beckman Coulter، آمریکا) و رسوب اگزوزوم در ۱۰۰ میکرولیتر از محلول PBS حل شد. محلول یکنواخت حاوی اگزوزوم تا انجام تست های تأییدی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

جداسازی اگزوزوم شیر با استفاده از PEG (PEG):

در این روش برای رسوب دهی اگزوزوم از محلول PEG 6000 استفاده گردید. ابتدا شیر خام با شدت ۳۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپ رویی به ظرف جدید منتقل و با شدت ۹۰۰۰ g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد سوپ رویی حاصل از مرحله قبل با شدت ۱۵۰۰۰ g به مدت

کیت دنبال شد و در نهایت محلول یکنواخت حاوی اگزوزوم تا انجام تست های تأییدی در دمای ۲۰- نگهداری شد.

آماده سازی به منظور عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی نگاره:

محلول اگزوزوم جداسازی شده با ۱ میلی لیتر گلو تار آلد هید ۲/۵ درصد در محلول ۰/۱ مولار سدیم کاکودیلات (pH=۷) به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد فیکس شد. سپس محلول های فیکس برداشته شد و نمونه با ۱ میلی لیتر بافر ۰/۱ مولار سدیم کاکودیلات در دمای اتاق شسته شد. این مرحله ۳ بار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه تکرار شد. نمونه با ۱ میلی لیتر تتروکسید اوسمیم ۲ درصد به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد فیکس شد. مجدداً محلول های فیکس برداشته شد و مانند مرحله ۲ با بافر ۰/۱ مولار سدیم کاکودیلات شسته شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه به ترتیب بوسیله اتانول با غلظت های مختلف (به ترتیب ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد) روی شیکر انکوبه شد. در نهایت به منظور تبخیر اتانول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM (مدل VEGA3، ساخت شرکت TESCAN، کشور جمهوری چک) انجام شد (Jung & Mun, 2018).

نتایج:

نتایج جداسازی اگزوزوم و اطمینان از صحت و کیفیت جداسازی و زیکول ها در این پژوهش با استفاده از روش DLS و میکروسکوپ الکترونی گزارش و در نهایت دو نمودار مقایسه ای مستخرج از نتایج DLS برای PI و میانگین قطر ذرات ارائه شده است.

بررسی اندازه ذرات جداسازی شده با DLS:

با استفاده از روش DLS قطر ذرات جداسازی شده و درصد فراوانی آنها مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در شکل ۱ و شکل ۲ قابل مشاهده است، میانگین قطر ذرات جداسازی شده با روش های اولتراسانتریفیوژ، کیت اگزوسیپ و کیت آناگرو به ترتیب ۱۷۶، ۱۴۲ و ۱۲۳ نانومتر می باشد. در روش جداسازی با PEG، میانگین قطر ذرات بیشتر و ۲۶۳ نانومتر مشاهده گردید (شکل ۲). در نتایج کیت اگزوسان، میانگین قطر ذرات حدود ۱۵۴ نانومتر محاسبه شد (شکل ۲) که با نتایج نمودار حاصل از DLS (شکل ۱) متفاوت است. شکل ۱ حاکی از هتروژن و ریز بودن ذرات جداسازی شده با کیت اگزوسان است.

کیت اگزوسان (Exosun):

در این روش ابتدا شیر خام با شدت ۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپ رویی به ظرف جدید منتقل و بافر B کیت اگزوسان (شرکت اگزوسان، ایران) با نسبت ۱ به ۴ به سوپ رویی اضافه گردید. سپس مخلوط حاصل با دور ۹۰۰۰g به مدت یک ساعت سانتریفیوژ شد. در این مرحله سوپ رویی به ظرف جدید منتقل شده و بافر A کیت به نسبت ۱ به ۸ به آن افزوده و طبق پروتکل کیت یک شب در دمای ۴ درجه انکوبه شد. سپس برای رسوب دادن اگزوزوم، به مدت نیم ساعت با شدت ۳۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی گراد، سانتریفیوژ انجام گردید. رسوب اگزوزوم حاصل در بافر PBS حل شده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس برای نگهداری طولانی مدت به دمای ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل گردید.

آماده سازی نمونه های حاوی اگزوزوم به منظور مشخصه-یابی:

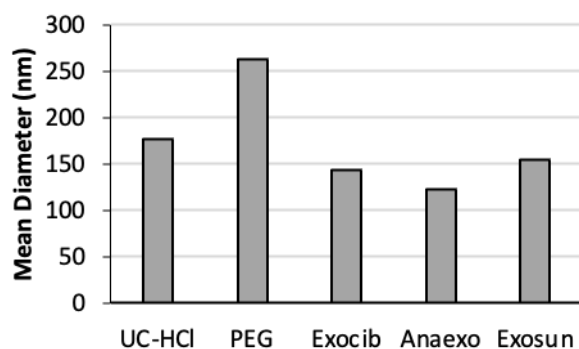
آماده سازی به منظور انجام تست DLS:

نمونه اگزوزوم پس از ذوب شدن، با استفاده از PBS، ۱۰۰ برابر رقیق و برای انجام تست DLS (دستگاه Zetasizer، شرکت Malvern) آماده سازی شد.

آماده سازی به منظور عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی:

گذاره:

گرید مسی با پوشش کربنی تهیه شد. سپس اگزوزوم های جداسازی شده با ۱ میلی لیتر پارافرمالدهید (PFA) ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه فیکس شد. ۵ تا ۷ میکرولیتر از محلول سوسپانسیون اگزوزوم روی گرید مسی قرار داده شد و به مدت ۱ دقیقه انکوبه شد. سپس بلافاصله با ۲۰ قطره محلول یورانیل استات (UA) ۱٪ فیلتر شده، روی سطح گرید توسط سرنگ رنگ آمیزی شد. محلول UA اضافی روی گرید با استفاده از کاغذ صافی برداشته شد. سپس گرید به سرعت با یک قطره آب شسته شد. این مرحله محلول اضافی رنگ را از بین می برد. پس از آن روی گرید با یک ظرف کشت پوشانده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق خشک شد و سپس عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی گذاره (مدل EM10C-100 KV، ساخت شرکت Zeiss، کشور آلمان) صورت گرفت (Jung & Mun, 2018).

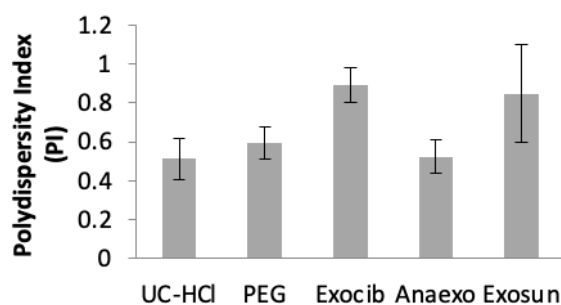


شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین قطر ذرات (Mean Size) در روش های مختلف جداسازی اگزوزوم. نمودارها به ترتیب از چپ به راست مربوط به روش های UC-HCl, PEG, Exocib, Anaexo, و Exosun می شوند.

Figure 2. Comparison diagram of mean size in different exosome isolation methods. The diagrams correspond to the methods (in order from the left to right) UC-HCl, PEG, Exocib, Anaexo, Exosun.

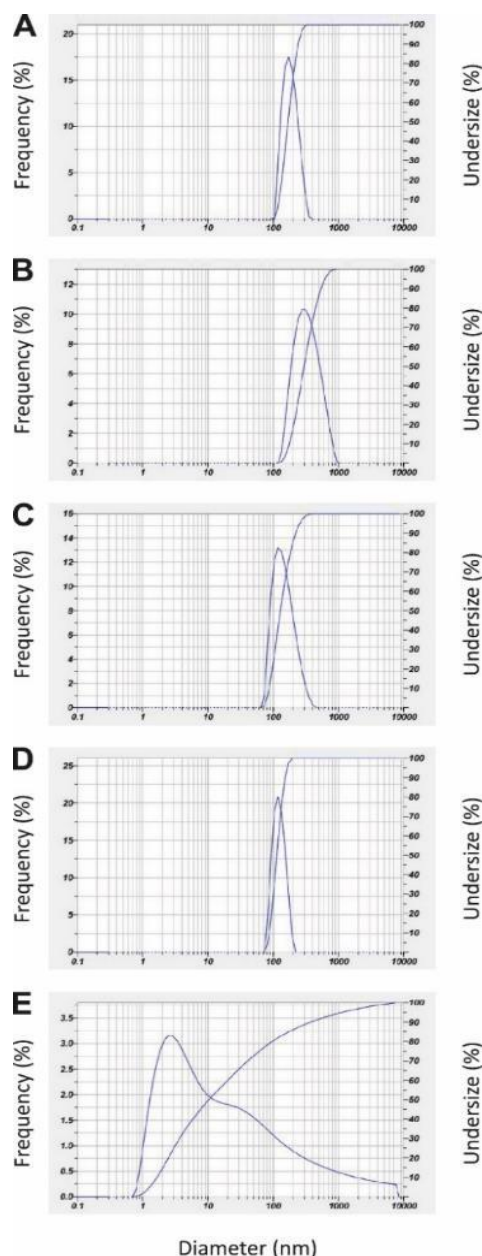
نمودار مقایسه ای PI در روش های جداسازی:

شاخص PI (شاخص پراکندگی) براساس هتروژن بودن اندازه ذرات در نمونه، محاسبه و در نتایج DLS ارائه می شود. همچنین نتیجه ظاهری این شاخص یعنی هم اندازه و هم شکل بودن ذرات در نتایج میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده است. مقادیر استاندارد برای هموژن بودن (monodisperse) نمونه، بین ۰/۵ تا ۰/۷ و مقادیر بیش از این، نشان دهنده هتروژن بودن (polydisperse) سایز و شکل ذرات است. در شکل ۳، نمودار PI بدست آمده از تمامی روش ها بصورت ستونی نشان داده شده است که کمترین مقدار مربوط به روش UC-HCl و بیشترین مربوط به Exocib است.



شکل ۳- نمودار مقایسه PI در روش های مختلف جداسازی اگزوزوم. این شاخص نمایانگر میزان هموژن بودن سایز ذرات نمونه پس از جداسازی است. نمودارها مربوط به روش های (به ترتیب از سمت چپ) UC-HCl, PEG, Exocib, Anaexo, و Exosun می شوند.

Figure 3. Comparison diagram of PI in different exosome isolation methods. This index shows the degree of homogeneity of sample particle size after isolation. The diagrams correspond to the methods (in order from the left) UC-HCl, PEG, Exocib, Anaexo, Exosun.



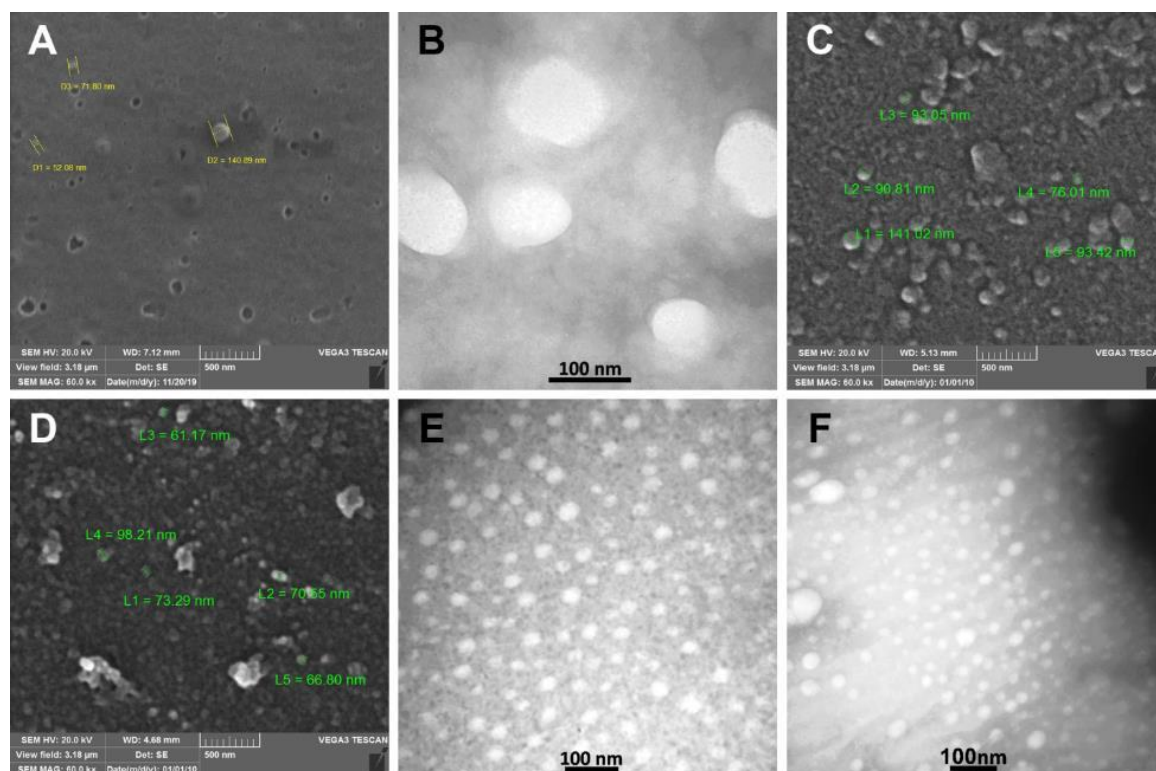
شکل ۱- بررسی اگزوزوم های جداسازی شده توسط روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS). سایز و درصد فراوانی ذرات جداسازی شده توسط روش های (A) UC-HCl, (B) PEG, (C) Exocib, (D) Anaexo, (E) Exosun قابل مشاهده است.

Figure 1. Study of isolated exosomes via DLS. The size and frequency percentage of isolated particles via A) UC-HCl, B) PEG, C) Exocib, D) Anaexo, E) Exosun.

حفظ شده و ساختار کروی و یا فنجان‌ی شکل قابل مشاهده است. در این تصاویر قطر اگزوزوم‌ها حدوداً بین ۵۰ الی ۱۵۰ نانومتر می باشد، تنها در نتایج کیت اگزوسان در کنار ذرات ۵۰ نانومتری، ذرات بسیار ریزی بین ۲۰ الی ۳۰ نانومتر (شکل F-۴ و E-۴) قابل مشاهده است.

مشخصه‌یابی اگزوزوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی:

نتایج میکروسکوپ الکترونی (شکل ۴) نشان می‌دهد که تمامی روش‌ها در جداسازی اگزوزوم موفق عمل کرده‌اند، چرا که ذرات جداسازی‌شده، مورفولوژی و محدوده سایزی اگزوزوم را دارا هستند و همچنین در اغلب روش‌ها تمامیت غشای اگزوزوم‌ها

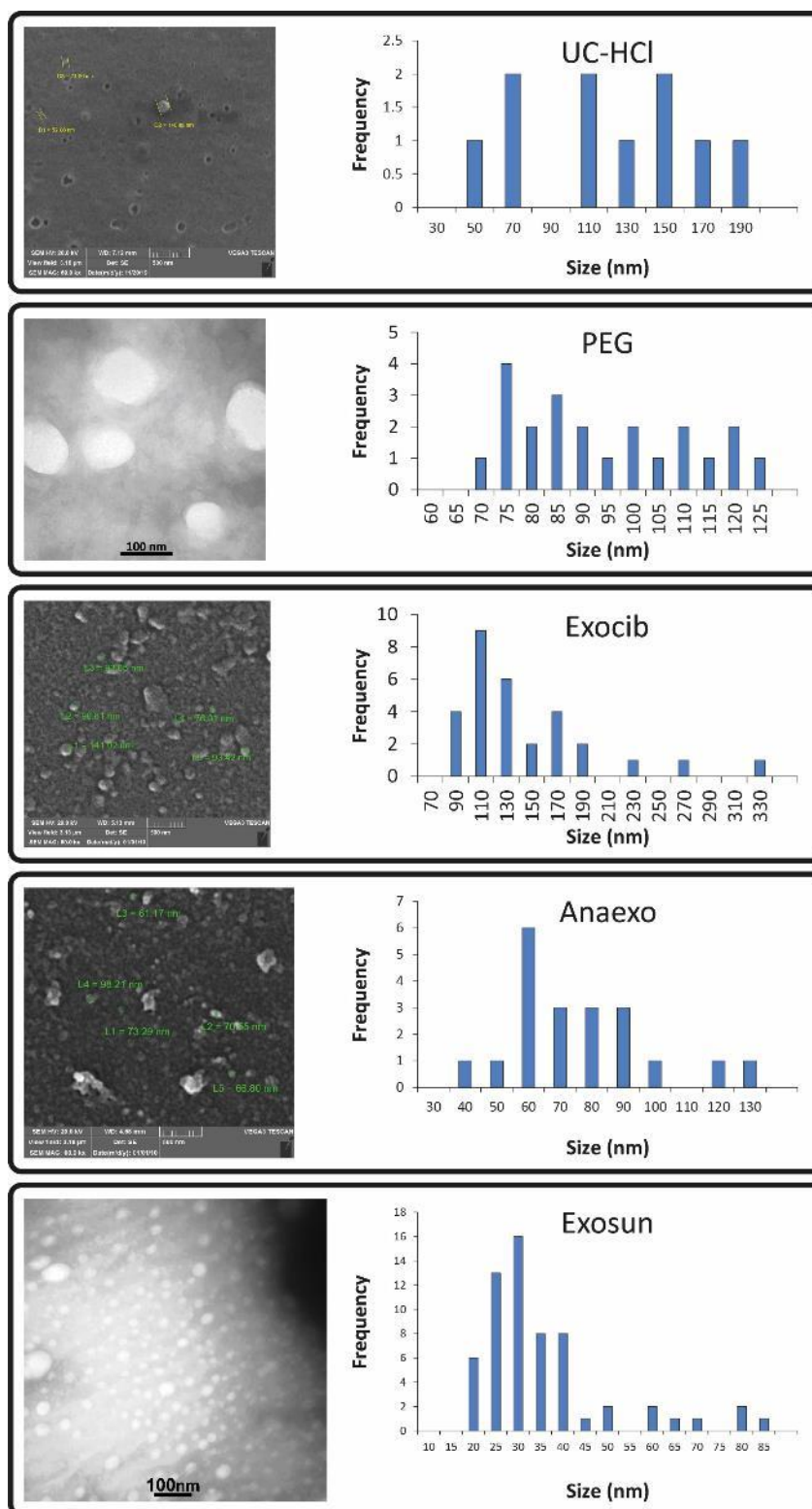


شکل ۴- عکس‌های میکروسکوپ الکترونی اگزوزوم‌های جداسازی‌شده با استفاده از روش‌های مختلف. ذرات گرد و بیضی شکل جداسازی‌شده توسط روش‌های (A) UC-HCl، (B) PEG، (C) Exocib، (D) Anaexo، (E) Exosun و (F) Exosun. قابل مشاهده است.

Figure 4. Electron microscopy images of isolated exosomes via various methods. Isolated globular and oval shape particles via methods A) UC-HCl, B) PEG, C) Exocib, D) Anaexo, E) Exosun are observable.

روش‌های انجام شده در بازه اندازه‌ای اگزوزوم (۳۰ الی ۱۵۰ نانومتر) قرار دارند و این شاخص، یکی دیگر از شواهد اثبات‌کننده حضور اگزوزوم در نمونه جداسازی‌شده می‌باشد.

در شکل ۵ نمودار پراکندگی سایز ذرات در روش‌های مختلف جداسازی قابل مشاهده است. عکس‌های میکروسکوپ الکترونی با استفاده از نرم‌افزار ImageJ آنالیز شده و فراوانی ذرات در اندازه‌های مختلف نشان داده شده است. ذرات بدست‌آمده از همه



شکل ۵- نمودار پراکندگی سایز ذرات (قطر اگزوزوم برحسب نانومتر) در جداسازی با استفاده از روش‌های مختلف. نمودار اول: UC-HCl، نمودار دوم: PEG، نمودار سوم: Exocib، نمودار چهارم: Anaexo و نمودار پنجم: مربوط به کیت اگزوسان (Exosun) است. در نمودارهای هیستوگرام، فراوانی سایزهای مختلف ذرات اگزوزوم قابل مشاهده است.

Figure 5. Comparison diagram of particle size (diameter of exosome in nanometers) in isolation using different kits. The first diagram: UC-HCl, the second diagram: PEG, the third diagram: Exocib, the fourth diagram: Anaexo, and the fifth diagram: is related to the Exosun kit. In the histogram diagrams, the frequency of different sizes of exosome particles can be observe.

بحث

اگزوزوم‌ها، وزیکول‌های خارج سلولی با اندازه‌ای بین ۳۰ الی ۱۵۰ نانومتر هستند که محموله مولکولی پیچیده‌ای را با خود حمل می‌کنند و به سلول‌های گیرنده می‌رسانند و به این ترتیب به عنوان یک سیستم ارتباطی بین سلولی عمل می‌کنند. در واقع می‌توان این‌گونه بیان کرد که اگزوزوم‌ها نانوحامل‌های زیستی هستند که به خوبی نقش خود را در انتقال مواد زیستی مختلف در درون موجودات ایفا می‌کنند. امروزه محققین در جستجوی به‌کارگیری این نانوزیکول‌ها در سیستم‌های دارورسانی هستند (Chen et al., 2021). با وجود تمامی مزایایی که اگزوزوم‌ها به عنوان حامل دارویی با خود همراه دارند، ولی دو مشکل اساسی باعث شده تا کنون چندان در حوزه درمان موفق ظهور نکنند؛ یکی پر هزینه بودن تولید انبوه اگزوزوم از سلول‌های انسانی و دیگری عدم دست‌یابی به یک روش کارآمد و به‌صرفه برای جداسازی اگزوزوم (Yakubovich et al., 2022). امروزه با شناسایی و جداسازی موفقیت‌آمیز اگزوزوم‌های فراوان از شیر انسان و دیگر حیوانات، به عنوان یک منبع ارزان و دردسترس برای تولید اگزوزوم، این امید در ذهن محققین نقش بسته است که می‌توان به تجاری‌سازی این نانوساختارهای زیستی اندیشید. در این مطالعه هدف بر آن بود با مقایسه کارآمدی چند کیت داخلی برای جداسازی اگزوزوم از شیر گاو و مقایسه نتایج آن با روش استاندارد اولتراسانتریفیوژ، روشی ساده و مقرون‌به‌صرفه برای جداسازی اگزوزوم از شیر گاو معرفی گردد. مشکل اصلی در مورد جداسازی اگزوزوم از شیر، حضور نانومیسل‌های چربی و مقادیر زیاد میسل‌های کازئین است که در امر جداسازی تداخل ایجاد می‌کند (Benmoussa et al., 2020) و بنابراین هر روشی بتواند این مشکل را مرتفع سازد، می‌تواند به عنوان روشی کارآمد برای تخلیص اگزوزوم از منابع مختلف شیر مطرح گردد. در این پژوهش، روش‌های اولتراسانتریفیوژ، رسوب‌دهی با PEG، کیت تجاری اگزوسیب، کیت تجاری آناگرو و کیت اگزوسان برای جداسازی اگزوزوم شیر مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که اساس تکنیک جداسازی در تمامی این کیت‌ها یکسان و مشابه رسوب‌دهی با PEG است، بنابراین می‌توان به راحتی به مقایسه آنها پرداخت.

در پژوهش‌های انجام‌شده متداول‌ترین روش، اولتراسانتریفیوژ است که در اغلب موارد از بازده بالایی نیز برخوردار است ولی روشی مقرون‌به‌صرفه و دردسترس نیست. در پژوهشی برای افزایش کارایی این روش از رسوب اسیدی به‌منظور حذف پروتئین‌های شیر استفاده شد و در نهایت مقایسه نتایج روش اولتراسانتریفیوژ و روش رسوب اسیدی به‌همراه اولتراسانتریفیوژ،

نشان داد که اگزوزوم‌ها در روش رسوب اسیدی مانند روش اولتراسانتریفیوژ به خوبی و بدون شکسته شدن دیواره جدا شدند و ویژگی‌های مورفولوژیکی این وزیکول‌ها کاملاً شبیه روش اول بود با این تفاوت که بعضی از اگزوزوم‌ها در رسوب اسیدی، سطح ناهمواری داشتند که می‌تواند به دلیل اثر pH پایین بر پروتئین‌های سطحی اگزوزوم باشد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که اگزوزوم‌ها با استفاده از روش رسوب اسیدی بدون تخریب جدی جدا شدند و این روش می‌تواند جایگزین اولتراسانتریفیوژ به تنهایی شود. از طرفی در این روش حذف کازئین که یکی از مراحل مهم در جداسازی اگزوزوم شیر است به خوبی صورت گرفت (Yamauchi et al., 2019). در پژوهش حاضر نیز با الگوبرداری از روش استفاده‌شده در منبع ذکرشده، ابتدا کازئین شیر با کاهش pH حذف و اگزوزوم آن با استفاده از اولتراسانتریفیوژ جداسازی شد. شواهد میکروسکوپ الکترونی نشان داد که مورفولوژی ذرات جداشده با اگزوزوم مطابقت دارد و همچنین نتایج بدست آمده از تکنیک DLS محدوده سایزی اگزوزوم را تأیید نمود. از لحاظ هتروژن بودن سایز و شکل ذرات، اگزوزوم‌های جداشده با UC-HCI یکسان‌تر ولی از تراکم کمی برخوردار بودند (شکل ۲). از آنجایی که نتایج مطالعه ذکرشده، تأیید کرده است که تیمار با HCl تأثیری بر ساختار اگزوزوم‌ها و تخریب آنها ندارد، بنابراین ممکن است آماده‌سازی نمونه برای عکسبرداری در این مسأله دخیل بوده که اگزوزوم‌های کمتری جداسازی شده است.

در پژوهشی دیگر، اگزوزوم‌های شیر گاو و انسان با استفاده از روش اولتراسانتریفیوژ و size exclusion chromatography جداسازی شدند. پس از جداسازی، غلظت اگزوزوم‌های هر دو روش با استفاده از NTA، و مورفولوژی ذرات با استفاده از TEM، و در نهایت با استفاده از ایمونوبلات و طیف‌سنجی جرمی، حضور نشانگرهای اگزوزومی ارزیابی شدند. ویژگی‌های اصلی مورفولوژی اگزوزوم‌ها یعنی کروی یا دونات شکل‌بودن، وجود نشانگرهای اگزوزومی مانند FLOT-1، CD9، CD81 و تعداد بالای ذرات در اگزوزوم‌های شیر انسان و گاو تأیید شد (Vaswani et al., 2019).

در مطالعه‌ای دیگری به‌منظور افزایش بازدهی، از اولتراسانتریفیوژ با گرادیان چگالی برای جداسازی اگزوزوم استفاده شده است. در این روش، جداسازی اگزوزوم‌ها بر اساس اندازه، جرم و چگالی آنها در یک محیط گرادیان چگالی از پیش ساخته شده در یک لوله سانتریفیوژ با کاهش تدریجی چگالی از پایین به بالا انجام می‌شود. برخلاف اولتراسانتریفیوژ افتراقی، نقطه ضعف اولتراسانتریفیوژ با گرادیان چگالی این است که

ظرفیت آن تا حد زیادی توسط ناحیه بارگذاری باریک، محدود شده است (K. Vaswani et al., 2017). با وجود آنکه میزان خلوص در این روش بالاتر رفته است، ولی از اشکالات مهم این روش می توان نیاز به حجم بالای نمونه (محدوده میلی لیتر تا لیتر)، آسیب یا تجمع اگزوزوم (به ویژه اگزوزوم هایی که از محلول های بسیار ویسکوز مانند شیر منشأ می گیرند)، آلودگی لیپوپروتئینی (لیپیدهایی با چگالی بالا (HDLs) و مشابه با اگزوزوم) برشمرد. این روش همچنین می تواند بسیار پرهزینه و زمان بر باشد (ممکن است بیش از ۲۴ ساعت طول بکشد) و درضمن خروجی و بازدهی کمی هم داشته باشد (Wijenayake et al., 2021).

اولتراسانتریفیوژ، پرکاربردترین روش برای استخراج اگزوزوم بوده است اما محدودیت هایی همانند نیاز به تجهیزات گران قیمت و زمان بر بودن، استفاده از آن را محدود کرده است (Helwa et al., 2017; Li et al., 2022). به همین منظور روش رسوب پلیمری می تواند جایگزین مناسبی برای این روش قرار گیرد. در این روش پلیمرهایی همچون پلی اتیلن گلیکول (PEG) با ایجاد شبکه و به دام انداختن تعداد زیادی ذرات اگزوزومی، شرایط را برای رسوب دهی در شدت دور پایین توسط سانتریفیوژ فراهم می سازد و به این ترتیب نیاز به دستگاه اولتراسانتریفیوژ مرتفع می گردد. به این ترتیب، روش بعدی که در این پژوهش مورد ارزیابی قرار گرفت، جداسازی با استفاده از پلیمر PEG 6000 بود. ذرات وزیکولی ۱۰۰ نانومتری جدا شده توسط PEG در تصاویر میکروسکوپ الکترونی، مشاهده شدند. از آنجایی که پلیمر PEG در غلظت های بالا توانایی رسوب دادن پروتئین را هم داراست، بنابراین احتمال آلودگی به پروتئین در چنین روش هایی افزایش می یابد. در پژوهشی که اگزوزوم های سرم با استفاده از روش های متفاوت از جمله کیت های تجاری (بر اساس رسوب دهی با PEG) تخلیص شدند، به این نکته اشاره شده است که PEG می تواند باعث رسوب ذرات غیراگزوزومی سرم هم شود (Helwa et al., 2017). جداسازی وزیکول های خارج سلولی می تواند با رسوب همزمان نوکلئوپروتئین ها و پروتئین های غیراگزوزومی مانند آلبومین، آپولیپوپروتئین E و همچنین ایمونوگلوبولین ها و کمپلکس های ایمنی همراه باشد (M. Y. Konoshenko et al., 2018). در نتیجه در مورد شیر که حاوی مقادیر زیادی از پروتئین و میسل های چربی است، نیز می توان چنین اتفاقی صورت گیرد.

کیت های تجاری که در حال حاضر در دنیا بر اساس رسوب دهی با PEG یا پلیمرهای دیگر به فروش می رسند، می توان به مواردی همچون کیت ExoQuick (شرکت Biosciences ایالات متحده)، کیت جداسازی اگزوزوم تام (شرکت Invitrogen، ایالات متحده)، کیت (شرکت HansaBioMed استونی)، کیت خالص سازی اگزوزوم (شرکت Norgenadaek کانادا) و کیت جداسازی miRCURY (شرکت Exiqon دانمارک) اشاره کرد. مقدار و کیفیت اگزوزوم ها و microRNA جدا شده با استفاده از محلول آماده شده PEG 6000 می تواند تا حدودی با کیت های تجاری برابری کند، اما هزینه روش به طور قابل توجهی کمتر است. این روش ساده، سریع و مقیاس پذیر است. همین عوامل، این روش را برای تحقیقات بالینی جذاب تر می کند. با این حال، همانطور که پیش تر اشاره شد روش پلی مری معایبی نیز دارد که مهم ترین آن آلودگی متغیر نمونه با پروتئین ها، کمپلکس های پروتئینی، لیپوپروتئین ها، نوکلئوپروتئین ها و همچنین ذرات ویروسی است (M. Y. Konoshenko et al., 2018).

در پژوهشی از کیت اگزوکوئیک که یکی از رایج ترین کیت های تجاری تخلیص اگزوزوم به شمار می رود و اساس آن هم رسوب دهی با پلیمر PEG است، به منظور جداسازی اگزوزوم شیر استفاده شده است. نتایج بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی نشان می دهد که اگزوزوم های جداسازی شده با این روش نسبت به روش اولتراسانتریفیوژ تغییر ساختاری قابل ملاحظه ای داشته است (Wijenayake et al., 2021). همچنین در مطالعه ای دیگری که از کیت اگزوکوئیک برای جداسازی اگزوزوم از شیر استفاده شده، نتایج به دست آمده حاکی از آن است که مورفولوژی ذرات اگزوزوم تا حدودی تغییر کرده ولی بطور کلی این کیت به عنوان روشی سریع و با بازده بالا برای جداسازی اگزوزوم شیر ارزیابی شده است (Yamada et al., 2012).

در پژوهش حاضر، سه کیت تجاری داخلی که بر اساس رسوب دهی با پلیمر طراحی شده اند، مورد ارزیابی قرار گرفت. قابل ذکر است که هر سه کیت برای اولین بار در این پژوهش به منظور جداسازی اگزوزوم از شیر گاو به کار گرفته شده اند. همانطور که در پیش اشاره گردید، یکی از مرسوم ترین روش های به کار رفته در کیت های تجاری، رسوب دهی با پلیمر است. ساده و کم هزینه بودن این روش، دلیل مهم دیگری است که امروزه به عنوان روشی برای جداسازی اگزوزوم در مقیاس وسیع مورد توجه قرار گرفته است. در تصاویر میکروسکوپ الکترونی، مربوط به اگزوزوم های جداسازی شده با کیت اگزوسیپ، آناگزو و اگزوسان، فراوانی بالایی از وزیکول ها قابل مشاهده است. در مورد کیت

از مزایای غیرقابل انکار تخلیص وزیکول ها با PEG می توان به سادگی، سرعت و همچنین امکان کار در محدوده pH فیزیولوژیکی و وابستگی ضعیف به غلظت یون اشاره کرد. از

توان ششم قطر ذره است، این تکنیک را نسبت به حضور ذرات بزرگ بسیار حساس می‌کند. اگر هدف شناسایی مقادیر بسیار کم ذرات درشت باشد (به طور مثال، شناسایی تجمع ذرات و ناپایداری آنها)، این توانایی می‌تواند یک مزیت باشد، اما در عین حال می‌تواند یک اشکال بزرگ برای تعیین دقیق اندازه در محلول‌های هتروژن (حاوی ذرات ریز در کنار ذرات درشت‌تر هستند) باشد (Filipe et al., 2010). در این حالت به دلیل حساس بودن تکنیک به ذرات درشت‌تر، با وجود ناپیچ بودن این ذرات در کنار ذرات ریز، میانگین اندازه ذرات، خیلی بیشتر از واقعیت برآورد خواهد شد. از آنجایی که اندازه ذرات در تصاویر میکروسکوپی با توجه به مقیاس درج شده در تصاویر به خوبی قابل محاسبه است، بنابراین می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری کرد، با وجود سهولت و حساسیت بالای تکنیک DLS، برای مشخصه‌یابی اگزوزوم‌ها، عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی نتایج مطمئن‌تری در اختیار محقق قرار می‌دهد. به این ترتیب نتایج حاصل از این پژوهش متکی بر اطلاعات بدست آمده از تصاویر میکروسکوپی در جدول ۱ به طور خلاصه بیان شده است.

همانگونه که مشخص است بازدهی کیت‌های تجاری بیشتر از روش اولتراسانتریفیوژ بوده است. البته این امکان وجود دارد که آلودگی پروتئینی در روش‌های رسوبدهی با پلیمر (کیت‌های تجاری استفاده شده در این پژوهش) بیشتر از روش اولتراسانتریفیوژ باشد که در این مطالعه به آن پرداخته نشده است ولی در هر صورت می‌توان امید داشت با مطالعات کامل‌تر در این خصوص و رفع نواقص احتمالی، روش رسوبدهی پلیمری به عنوان یک انتخاب مناسب برای تولید انبوه اگزوزوم در مصارف تجاری، مورد استفاده قرار گیرد.

اگزوسان با وجود مشاهده ذرات بسیار منظم و یکدست، محدوده سایزی اگزوزوم‌های جداسازی‌شده کوچک‌تر از دو کیت دیگر و همچنین کوچک‌تر از اگزوزوم‌های جداسازی‌شده با روش اولتراسانتریفیوژ و رسوبدهی با PEG می‌باشد (شکل ۴ و ۵). مشاهده اگزوزوم‌هایی با اندازه کوچکتر از ۳۰ نانومتر در مطالعات دیگران هم سابقه داشته است. طبق گزارش‌های مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۱، در نتایج اگزوزوم‌های جداسازی‌شده از رده سلولی COLO 205، وزیکول‌های بسیاری با سایز کوچک‌تر از ۳۰ نانومتر به خوبی قابل مشاهده است (Dash et al., 2021). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۹ هم ذراتی با اندازه کوچک از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژل وارئون جداسازی شده است (Chopra et al., 2019).

در این پژوهش دو تکنیک رایج جهت مشخصه‌یابی اگزوزوم‌ها، روش پراکندگی دینامیکی نور (DLS) و عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی، برای مقایسه روش‌های مختلف جداسازی مورد استفاده قرار گرفت. همانگونه که در بخش نتایج هم به آن اشاره گردید، در برخی موارد نتایج DLS با تصاویر میکروسکوپی همخوانی نداشت؛ به طور مثال، در روش رسوبدهی PEG نتایج DLS نشان‌دهنده بزرگ‌بودن ذرات جداسازی‌شده بود (میانگین قطر ذرات = ۲۶۳ نانومتر)، در صورتی که تصاویر میکروسکوپی ذراتی با سایز بین ۷۰ الی ۱۲۰ نانومتر را نشان می‌داد. همین‌طور در مقایسه نتایج DLS و تصاویر میکروسکوپی کیت اگزوسان مشخص است که DLS توانایی شناسایی ذرات ریز در حضور ذرات درشت را به خوبی ندارد. این مسأله به اساس این تکنیک برمی‌گردد. در تکنیک DLS، اندازه ذرات از نوسانات شدت نور پراکنده شده ناشی از حرکت براونی ذرات در محلول تعیین می‌شود. این واقعیت که شدت نور پراکنده شده متناسب با

جدول ۱- مقایسه روش های جداسازی اگزوزوم شیر بر اساس نتایج تصاویر میکروسکوپ الکترونی و تکنیک DLS

Table 1. Comparison of milk exosomal separation methods based on the results of electronic microscope and DLS techniques

روش جداسازی	اساس تکنیک	محدوده سایز ذرات*	شاخص پراکندگی (PI**)	تراکم ذرات در تصاویر میکروسکوپی
اولتراسانتریفیوژ (UC-HCl)	جداسازی بر اساس سایز و چگالی	۵۰-۱۹۰ نانومتر	مناسب (بین ۰/۷ - ۰/۵)	پایین
رسوبدهی با پلی اتیلن گلیکول (PEG)	تشکیل شبکه پلیمری و تجمع ذرات	۷۰-۱۲۰ نانومتر	مناسب (بین ۰/۷ - ۰/۵)	پایین
کیت تجاری اگزوسیب (Exocib)	رسوبدهی با پلیمر	۹۰-۲۰۰ نانومتر	نامناسب (≥ 0.7)	بالا
کیت تجاری آناگزو (Anaexo)	رسوبدهی با پلیمر	۴۰-۱۳۰ نانومتر	مناسب (بین ۰/۷ - ۰/۵)	بالا
کیت تجاری اگزوسان (Exosun)	رسوبدهی با پلیمر	۲۰-۸۰ نانومتر	نامناسب (≥ 0.7)	بالا

* بر اساس تصاویر میکروسکوپ الکترونی محاسبه گردیده است.

** بر اساس نتایج DLS محاسبه گردیده است. شاخص پراکندگی یک پارامتر نسبی است و برای محلول های هتروژنی مثل اگزوزوم (حاوی ذرات با سایزهای متفاوت)، بالا بودن مقدار آن (≥ 0.7) محتمل است.

نتیجه گیری:

نزدیک جایگاه ویژه ای در نانوحامل دارویی در حوزه درمان برای خود باز خواهند کرد.

Abbreviation

HUVECs: Human umbilical vein endothelial cells

MSC: Mesenchymal stem cells

DC: Dendritic cells

NK: Natural killer cells

PEG: polyethyleneglycol

PBS: Phosphate buffered saline

PFA: Paraformaldehyde

UA: Uranyl acetate

PI: Polydispersity index

NTA: nanoparticle tracking analysis

سپاسگزاری:

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه الزهراء (س) جهت در اختیار گذاشتن تجهیزات و امکانات آزمایشگاهی برای پیشبرد اهداف این پژوهش، اعلام می دارند

بنابراین می توان اینگونه نتیجه گیری کرد که هر چند روش اولتراسانتریفیوژ یکی از رایج ترین روش های جداسازی اگزوزوم به حساب می آید ولی به دلیل پرهزینه بودن و نیاز به تجهیزات ویژه، همچنان روش های رسوبدهی با پلیمر می تواند گزینه مناسبی برای جداسازی اگزوزوم از شیر به شمار روند. با وجود آنکه احتمال آلودگی پروتئینی در روش های رسوبدهی با پلیمر (اغلب کیت های تجاری تخلیص اگزوزوم) وجود دارد ولی اگر هدف تولید وسیع و استفاده صنعتی از اگزوزوم های شیر به عنوان یک نانوحامل دارویی مدنظر باشد، بهینه ترین روش تخلیص، همین روش محسوب می شود. بنابراین لازم است مطالعات بیشتری در خصوص مکانیسم رسوبدهی اگزوزوم ها با پلیمرها و عوامل دخیل در آن صورت گیرد تا بتوان میزان آلودگی پروتئینی را به حداقل رساند و یا به طور کامل حذف کرد. در این صورت می توان امیدوار بود که اگزوزوم های شیر در آینده ای

REFERENCES:

- Adriano, B., Cotto, N. M., Chauhan, N., Jaggi, M., Chauhan, S. C., & Yallapu, M. M.** 2021. Milk exosomes: Nature's abundant nanoplatform for theranostic applications. *Bioactive Materials* 6: 2479-2490.
- Bae, I. S., & Kim, S. H.** 2021. Milk Exosome-Derived MicroRNA-2478 Suppresses Melanogenesis through the Akt-GSK3 β Pathway. *Cells* 10.
- Benmoussa, A., Michel, S., Gilbert, C., & Provost, P.** 2020. Isolating Multiple Extracellular Vesicles Subsets, Including Exosomes and Membrane Vesicles, from Bovine Milk Using Sodium Citrate and Differential Ultracentrifugation. *Bio Protoc* 10: e3636.
- Caby, M.-P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G., & Bonnerot, C.** 2005. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International Immunology* 17: 879-887.
- Chen, H., Wang, L., Zeng, X., Schwarz, H., Nanda, H. S., Peng, X., & Zhou, Y.** 2021. Exosomes, a New Star for Targeted Delivery. *Front Cell Dev Biol* 9: 751079.
- Chopra, N., Dutt Arya, B., Jain, N., Yadav, P., Wajid, S., Singh, S. P., & Choudhury, S.** 2019. Biophysical Characterization and Drug Delivery Potential of Exosomes from Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells. *ACS Omega* 4: 13143-13152.
- Coughlan, C., Bruce, K. D., Burgy, O., Boyd, T. D., Michel, C. R., Garcia-Perez, J. E., . . . Potter, H.** 2020. Exosome Isolation by Ultracentrifugation and Precipitation and Techniques for Downstream Analyses. *Current protocols in cell biology* 88: e110-e110.
- Dash, M., Palaniyandi, K., Ramalingam, S., Sahabudeen, S., & Raja, N. S.** 2021. Exosomes isolated from two different cell lines using three different isolation techniques show variation in physical and molecular characteristics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1863: 183490.
- Doyle, L. M., & Wang, M. Z.** 2019. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells* 8: 727.
- Filipe, V., Hawe, A., & Jiskoot, W.** 2010. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res* 27: 796-810.
- Helwa, I., Cai, J., Drewry, M. D., Zimmerman, A., Dinkins, M. B., Khaled, M. L., . . . Liu, Y.** 2017. A Comparative Study of Serum Exosome Isolation Using Differential Ultracentrifugation and Three Commercial Reagents. *PLoS One* 12: e0170628.
- Jung, M. K., & Mun, J. Y.** 2018. Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy. *Journal of visualized experiments : JoVE*: 56482.
- Kandimalla, R., Aqil, F., Tyagi, N., & Gupta, R.** 2021. Milk exosomes: A biogenic nanocarrier for small molecules and macromolecules to combat cancer. 85: e13349.
- Konoshenko, M. Y., Lekchnov, E. A., Vlassov, A. V., & Laktionov, P. P.** 2018. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *BioMed research international* 2018: 8545347.
- Kotmakçı, M., & Erel Akbaba, G.** (2017). Exosome Isolation: Is There an Optimal Method with Regard to Diagnosis or Treatment? In (pp. 163-182).
- Lässer, C., Seyed Alikhani, V., Ekström, K., Eldh, M., Torregrosa Paredes, P., Bossios, A., . . . Valadi, H.** 2011. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *Journal of Translational Medicine* 9: 9.
- Li, W.-J., Chen, H., Tong, M.-L., Niu, J.-J., Zhu, X.-Z., & Lin, L.-R.** 2022. Comparison of the yield and purity of plasma exosomes extracted by ultracentrifugation, precipitation, and membrane-based approaches. *Open Chemistry* 20: 182-191.
- Melnik, B. C., Stremmel, W., Weiskirchen, R., John, S. M., & Schmitz, G.** 2021. Exosome-Derived MicroRNAs of Human Milk and Their Effects on Infant Health and Development. *Biomolecules* 11.
- Mohd Younus Bhat, T. A. D. a. L. R. S.** (2016). Casein Proteins: Structural and Functional Aspects, Milk Proteins - From Structure to Biological Properties and Health Aspects,.
- Munagala, R., Aqil, F., Jeyabalan, J., & Gupta, R. C.** 2016. Bovine milk-derived exosomes for drug delivery. *Cancer letters* 371: 48-61.
- Pisitkun, T., Shen, R.-F., & Knepper, M. A.**

2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 13368-13373.
- Sánchez, C., Franco, L., Regal, P., Lamas, A., Cepeda, A., & Fente, C.** 2021. Breast Milk: A Source of Functional Compounds with Potential Application in Nutrition and Therapy. *Nutrients* 13.
- Tang, Y.-T., Huang, Y.-Y., Zheng, L., Qin, S.-H., Xu, X.-P., An, T.-X., . . . Wang, Q.** 2017. Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *International journal of molecular medicine* 40: 834-844.
- Vaswani, K., Koh, Y. Q., Almughlliq, F. B., Peiris, H. N., & Mitchell, M. D.** 2017. A method for the isolation and enrichment of purified bovine milk exosomes. *Reproductive Biology* 17: 341-348.
- Vaswani, K., Mitchell, M. D., Holland, O. J., Qin Koh, Y., Hill, R. J., Harb, T., . . . Peiris, H.** 2019. A Method for the Isolation of Exosomes from Human and Bovine Milk. *Journal of Nutrition and Metabolism* 2019: 5764740.
- Wijenayake, S., Eisha, S., Tawhidi, Z., Pitino, M. A., Steele, M. A., Fleming, A. S., & McGowan, P. O.** 2021. Comparison of methods for pre-processing, exosome isolation, and RNA extraction in unpasteurized bovine and human milk. *PLoS One* 16: e0257633.
- Yakubovich, E. I., Polischouk, A. G., & Evtushenko, V. I.** 2022. Principles and Problems of Exosome Isolation from Biological Fluids. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 16: 115-126.
- Yamada, T., Inoshima, Y., Matsuda, T., & Ishiguro, N.** 2012. Comparison of methods for isolating exosomes from bovine milk. *J Vet Med Sci* 74: 1523-1525.
- Yamauchi, M., Shimizu, K., Rahman, M., Ishikawa, H., Takase, H., Ugawa, S., . . . Inoshima, Y.** 2019. Efficient method for isolation of exosomes from raw bovine milk. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 45: 359-364.
- Yang, X.-X., Sun, C., Wang, L., & Guo, X.-L.** 2019. New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes. *Journal of Controlled Release* 308: 119-129.
- Zhang, Q., Xiao, Q., Yin, H., Xia, C., Pu, Y., He, Z., . . . Wang, Y.** 2020. Milk-exosome based pH/light sensitive drug system to enhance anticancer activity against oral squamous cell carcinoma. *RSC Adv* 10: 28314-28323.
- Zhang, Y., Bi, J., Huang, J., Tang, Y., Du, S., & Li, P.** 2020. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *Int J Nanomedicine* 15: 6917-6934.
- Zhou, M., Weber, S. R., Zhao, Y., Chen, H., & Sundstrom, J. M.** (2020). Chapter 2 - Methods for exosome isolation and characterization. In L. Edelstein, J. Smythies, P. Quesenberry, & D. Noble (Eds.), *Exosomes* (pp. 23-38): Academic Press.

How to cite this article:

Ghandchi, H., Ramezani, R., Moosavinejad, Z. 2024. Investigating the inhibitory effect of new imidazole derivatives on cyclooxygenase II enzyme with computational approach. *Nova Biologica Reperta* 10: 22-40. (In Persian).

قندچی، ح.، رمضانی، ر. و موسوی نژاد، س. ز. ۱۴۰۲. بررسی مقایسه ای چند روش آزمایشگاهی برای جداسازی اگزوزوم های شیر گاو. یافته‌های نوین در علوم

زیستی ۱۰: ۲۲-۴۰.